
Estimativa da redução da contagem de *Staphylococcus aureus* através de tratamento térmico em amostras de leite experimentalmente contaminadas

Wellington Hartmann (Doutor)

Curso de Medicina Veterinária - UTP - Universidade Tuiuti do Paraná
Professor Orientador

Uriel Vinícius Cotarelli de Andrade (Doutor)

Curso de Medicina Veterinária - UTP - Universidade Tuiuti do Paraná

Marcelo Andrey Coradin (Discente)

Curso de Medicina Veterinária - UTP - Universidade Tuiuti do Paraná

Resumo

Staphylococcus aureus é o agente infeccioso considerado como maior causador das infecções na glândula mamária de vacas leiteiras, e por seu caráter crônico, tem expressiva predominância entre as bactérias isoladas no leite cru. O objetivo do presente trabalho foi estimar a velocidade de inativação bacteriana através do tratamento térmico pela pasteurização a 63°C, o tempo estritamente necessário para sua inativação, e quantificar as colônias estafilocócicas com relação ao tempo de inativação da enzima fosfatase. Amostras de leite integral esterilizado foram contaminadas com *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) obtendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL e distribuídas em 31 tubos com tampa de rosca e identificados. Um tubo foi utilizado para a contagem bacteriana inicial do leite, e os outros 30 para avaliar o agente nos tempos de 1 a 30 minutos em banho-maria a 63°C. A temperatura foi monitorada por um tubo contendo o mesmo volume de leite com termômetro; esse monitoramento foi igual nas 3 repetições. As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada (solução salina 0,85%) e 0,1 mL de cada diluição foi semeado na superfície de placas de Agar MCTA (*Microbial Content Test Agar*), em duplicata, e as placas incubadas por 24 dias a 37°C. As amostras de leite controle apresentaram contaminação média de 8,11 log UFC/mL. Com relação à redução bacteriana, observou-se que nos primeiros 5 minutos foi de 46,37%, aos 10 minutos foi de 63,63%, aos 20 minutos foi de 74,85% e aos 25 minutos foi de 100%.

Palavras-chave: bovinos; fosfatase; leite; *Staphylococcus*; tratamento térmico.

Abstract

Staphylococcus aureus is the infectious agent considered the major cause of infections in the mammary gland of dairy cows, and its chronic nature, has a significant prevalence among the isolated bacteria in raw milk. The aim of this work was to estimate the rate of bacterial inactivation by heat treatment by pasteurization at 63°C, the time necessary for its inactivation and quantify the staphylococcal colonies with respect to time of inactivation of the enzyme phosphatase. Samples of sterilized whole milk were contaminated with 10⁸ CFU of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and distributed in 31 tubes with screw cap and identification. A control tube was used for the initial bacterial count of milk, and the other 30 to evaluate the agent in time 1-30 minutes in a water bath at 63°C. The temperature was monitored by a tube containing the same volume of milk with a thermometer, this monitoring was similar in the three repetitions. The samples were submitted to serial decimal dilution (0.85% saline) and 0.1 mL of each dilution was plated on the surface of agar plates MCTA (*Microbial Content Test Agar*), in duplicate, and plates were incubated for 24 hours at 37°C. The control milk samples showed average of 8.11 log CFU/mL. Regarding to bacterial reduction, it was observed that in the first five minutes was 46.37%, at 10 minutes was 63.63%, at 20 minutes was 74.85% and after 25 minutes was 100%.

Key words: bovine; heat treatment; milk, phosphatase; *Staphylococcus*.

Introdução

A pecuária leiteira é uma importante atividade econômica e social, pois é geradora de empregos e renda, no meio rural. O segmento leite representa 17,4% do valor bruto da produção dos produtos de origem animal no Brasil, e está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz (FINEP, 2006). A indústria de laticínios se constitui em um dos segmentos mais importantes do setor alimentício, com produtos de alto valor nutritivo, destinados a todas as faixas etárias da população.

O Paraná responde por 10% da produção de leite do Brasil, com a produção de 2,9 bilhões de litros anuais em 2007 (IBGE, 2007) com aproximadamente 1.187.000 vacas ordenhadas sendo o segundo maior produtor de leite do país (IPARDES, 2008).

A qualidade do leite produzido e industrializado, sob o ponto de vista higiênico-sanitário, bem como a sua composição, tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores, constituindo grande preocupação por parte das indústrias de laticínios e dos agentes fiscalizadores, tendo em vista seu importante papel na nutrição humana, nas diversas faixas etárias. O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua

composição rica em proteínas, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporcionando nutrientes e proteção imunológica para o neonato (Hartmann, 2009). A qualidade do leite *in natura* pode ser influenciada por muitos fatores, destacando-se os fatores produtivos como sanidade, manejo, alimentação, genética dos rebanhos e os relacionados à obtenção, resfriamento e armazenamento do leite. Dentre estes, a infecção da glândula mamária constitui uma das causas que desempenham maior influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite, resultando no aumento na contagem de células somáticas (CCS), constituídas principalmente por células de defesa, bacterianas e descamação do epitélio glandular (Muller, 2002; Hartmann et al., 2009).

O agente infeccioso considerado como maior causador das infecções na glândula mamária de vacas leiteiras é o *Staphylococcus aureus*. Por seu caráter crônico, tem expressiva predominância entre as bactérias isoladas no leite cru, com 52,2% (Andrade et al., 2009). As bactérias do gênero *Staphylococcus spp*, são os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas associadas a falhas no manejo de ordenha, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos. Isto porque a transmissão dos agentes causadores

é predominantemente causada durante a ordenha, uma vez que o reservatório do gênero *Staphylococcus spp*. é a glândula mamária (Costa et al. 1995, Chapaval & Piekarski, 2000; Fagundes et al., 2010). *S. aureus* que produz diversos fatores de virulência, incluindo enterotoxinas, como as toxinas A e B e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Fagundes & Oliveira, 2004). Alimentos contaminados por toxinas estafilocócicas (SFP) são reconhecidamente causadores de graves surtos gastrointestinais (Jorgensen et al., 2005). No Brasil, apesar do número correto de surtos causados por SFP ser desconhecido, estudos recentes indicam que o leite não pasteurizado, assim como produtos lácteos preparados com o mesmo, ocupam importante papel nos surtos alimentares das populações (Tondo et al., 2000).

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil. De modo geral, o controle da qualidade do leite nas últimas décadas tem se restringido à prevenção de adulterações do produto *in natura* (Muller, 2002). Os critérios empregados para definir a qualidade do leite cru vêm sendo modificados para atender as demandas regulamentares oficiais, da indústria e dos consumidores e visam atender, prioritariamente, aos requisitos de segurança alimentar e melhor rendimento

industrial. Um dos requerimentos atuais da sociedade é a disponibilidade de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos, de todos os segmentos da rede de empresas, organizações, aparelhos reguladores do Estado e instituições que constituem a cadeia produtiva do leite. O direcionamento da pesquisa e da transferência de tecnologias para que tais demandas sejam atendidas é compromisso institucional e social inquestionável (Bressan & Martins, 2004).

A pasteurização tem como objetivos eliminar os microrganismos patogênicos que possam contaminar o leite, tornando-o um produto inócuo ao consumo humano, e diminuir sua carga bacteriana a limites aceitáveis, de acordo com normatização específica. A legislação brasileira estabelece que a pasteurização deve ser realizada, submetendo o leite a temperaturas entre 72 e 75°C por 15 a 20 segundos, na pasteurização rápida (HTST), ou entre 62 e 65°C durante 30 minutos, na pasteurização lenta (Brasil, 1996). A Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2002) permite a adoção da pasteurização de leite previamente envasado em usinas de beneficiamento que estejam sob inspeção estadual ou municipal. A aferição do respeito aos bons procedimentos da pasteurização é aferido por duas enzimas do leite: a fosfatase alcalina e a peroxidase. Estas enzimas são utilizadas nas indústrias para a

verificação da temperatura mínima e máxima a que o leite é submetido durante o tratamento térmico, tendo em vista que a fosfatase é inativada na mesma faixa de temperatura que o *Mycobacterium tuberculosis*, e a peroxidase deve estar intacta no leite pasteurizado. Assim, imediatamente após a pasteurização, o produto processado deve estar negativo para a enzima fosfatase e positivo para a enzima peroxidase (Brasil, 2002), como forma de garantir que a temperatura e o tempo recomendados tenham sido alcançados.

No Paraná, predominam pequenos produtores, e mais de 50% possuem menos que 10 vacas em ordenha (Conseleite, 2009). Em consequência, observa-se que o leite resfriado, conservado nas propriedades rurais, apresenta o desenvolvimento de flora específica, que passa a constituir preocupação às indústrias de laticínios, tornando-se impedimento ao salto tecnológico das indústrias, no seu propósito de desenvolver novos produtos para atender as expectativas de mercado, e para se enquadrar aos padrões internacionais. Nos últimos anos, têm surgido em várias regiões do país, pequenas indústrias destinadas ao processamento de pequenos volumes de leite, as quais têm buscado e ocupado determinados nichos de mercado (Timm et al., 2003). Algumas destas indústrias, como forma de diminuir custos com equipamentos, fazem uso da pasteurização lenta do leite previamente envasado, através da imersão

em água quente (Timm et al., 2004). A estratégia de agregação de valor pela pasteurização lenta do leite em microusinas pode representar uma alternativa para os pequenos produtores, quando eles conseguem comercializar seu produto sem custos elevados de transporte e produzir com baixos custos fixos de instalação. Equipamentos alternativos de comprovada eficiência podem colaborar na viabilização do uso da pasteurização lenta, transformando pequenos produtores em microempresários e colaborando para a formalização do comércio de leite fluido (Holanda et al., 2002; Schuster et al., 2006).

O objetivo deste estudo foi estimar a velocidade de inativação das colônias de *Staphylococcus aureus*, após a pasteurização lenta, e quantificar a inativação das mesmas com relação à desnaturação da fosfatase.

Material e métodos

O trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP), em Curitiba/PR, durante o período de julho de 2009 a junho de 2010. Uma amostra de 200 mL de leite esterilizado foi inoculado com um disco liofilizado de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)¹ e

incubado em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas. Em seguida, a amostra foi submetida à diluição decimal seriada (solução salina 0,85%) e 0,1 mL de cada diluição foi semeado na superfície de placas de Agar MCTA, em duplicata, e as placas incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C (Konemann, 2001). Amostras do tubo 0 (tubo controle) foram coletadas com *swab* e semeadas imediatamente em Agar MCTA (*Microbial Content Test Agar*²). Os tubos, numerados de 1 a 30, foram incubados em banho-maria a 63°C. Após um minuto cronometrado, o tubo 1 foi retirado, e assim sucessivamente até o tubo 30 aos trinta minutos. A partir de cada tubo que foi retirado, foi efetuada a semeadura através de *swab* esterilizado com raios gama, recomendado para coleta de amostras para bacteriologia.

O monitoramento da temperatura das amostras de leite nos tubos de ensaio, foi realizado através da utilização de um tubo específico para esta finalidade, contendo leite, que permaneceu durante o procedimento com um termômetro de 0 a 100°C; esse monitoramento foi igual nos 3 procedimentos. Tubos com leite cru foram empregados para avaliar as enzimas fosfatase alcalina e peroxidase após o processo³.

1 Microrganismo padrão estabilizado: Newprov – Pinhais/PR

2 Laborclin Produtos Para Laboratório Ltda – Pinhais/PR

3 Fosfatase Alcalina e Peroxidase: Laborclin Produtos Para Laboratório Ltda – Pinhais/PR.

As contagens foram estimadas seguindo o protocolo *Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens* (FDA, 2006). As contagens bacterianas foram transformadas para a escala logarítmica em base 10, usando-se a fórmula $t_{CTB} = \log_{10}(CTB + 0,5)$ (Brito et al., 2000). O tratamento estatístico foi realizado através do programa computadorizado Statistica® (6.0).

Resultados e discussão

Através da microscopia, foram observadas colônias Gram positivas em forma de cocos com aproximadamente 1 mm de diâmetro, dispostas em cachos de uva, resultantes da incubação das cepas biofilizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em Agar *Brain Heart Infusion* (BHI).

As amostras de leite controle apresentaram contaminação média de $1,29 \times 10^8$ UFC/mL ($\pm 0,04$), ou 8,11 Log UFC/mL, e o tratamento térmico demonstrou ser eficiente, reduzindo totalmente esta contagem bacteriana aos 25 minutos após o início do tratamento térmico (Figura 1).

Com relação à redução bacteriana, observou-se que nos primeiros 5 minutos foi de 46,37%, aos 10 minutos foi de 63,63%, aos 20 minutos foi de 74,85% e aos 25 minutos foi de 100%. Gao et alii. (2002) também descreveram a curva de inativação bacteriana obtida

pela pasteurização, utilizando leite contaminado com cepas de *Mycobacterium paratuberculosis*, observando-se inativação total após 15 minutos.

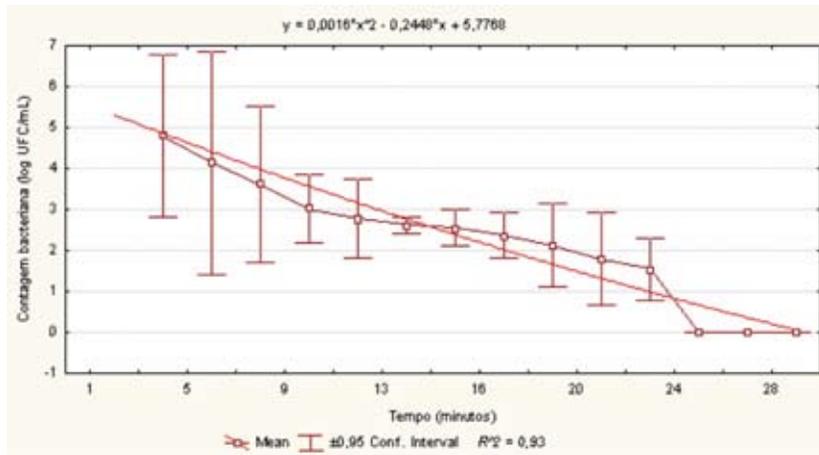
O teste de fosfatase é realizado nas indústrias para verificação de que o leite tenha ultrapassado a temperatura mínima de pasteurização. Verificou-se que, a partir de 4 minutos, o teste de fosfatase passou a ser negativo em todas as amostras, continuando positivo para peroxidase, como era esperado. Estes resultados estão de acordo com os relatos de Timm et al. (2004), que estudaram os efeitos da pasteurização lenta sobre a fosfatase. Embora tanto a pasteurização rápida como a lenta, adequadamente aplicadas, sejam eficientes na redução de microrganismos mesófilos aeróbicos, elas são influenciadas pela carga inicial de termodúricos e pelas características de termosensibilidade, ligadas à relação temperatura/tempo, dos microrganismos presentes no leite cru. Rodrigues (1996), testando um modelo de pasteurizador alternativo para pasteurização lenta de leite a granel, obteve redução microbiológica entre 75 e 99,9%. Entretanto, os maiores índices foram alcançados com temperaturas não permitidas pelas normas brasileiras (67 e 69 °C) e nem todas as contagens de coliformes termotolerantes, ficaram dentro dos limites exigidos pela legislação atual (Brasil, 2002). Um problema reportado à pasteurização lenta refere-se ao período que o leite leva para atingir a

temperatura de pasteurização, uma vez que a exposição de células bacterianas a temperaturas subletais acima de sua temperatura ótima de crescimento (choque térmico subletal) induz resistência ao subsequente aquecimento a altas temperaturas (Farkas, 2001).

Na análise de regressão, o coeficiente de determinação das variáveis tempo de exposição a 63°C e contagem de colônias das amostras estudadas foi de $R^2 = 0,93$, o que significa que 93% da variância é explicada pelo modelo (tempo e contagem bacteriana). O modelo estatístico possibilitou a obtenção da seguinte equação polinomial para estimar a velocidade de inativação de *Staphylococcus aureus* nas amostras estudadas:

$$y = 0,0016x^2 - 0,2448x + 5,7768$$

Figura 1: contagem bacteriana das três repetições nas amostras controle e nas amostras sob tratamento térmico em diferentes tempos de exposição.



Conclusão

Sob as condições do presente estudo, o tratamento térmico a 63°C mostrou eficiência para inativação de *Staphylococcus aureus* após 25 minutos.

Aos 4 minutos, o teste de fosfatase já estava negativo, porém ainda persistiam 42,79% das colônias ativas. Este teste, apesar de indicar que houve tratamento térmico, não assegura isoladamente confiabilidade dos produtos lácteos no que se refere à segurança alimentar.

Através da análise estatística dos resultados, foi possível obter-se uma equação polinomial que permitiu a estimativa de inativação das colônias estafilocócicas sob pasteurização lenta para o presente estudo.

Referências

- ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Revista Ars Veterinária*, v. 25, n. 3, p. 129-135, Jaboticabal-SP, 2009.
- BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 jun. 1997. Seção I, p. 11555-11558.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 183, seção I, p. 13-22, 20 set. 2002.
- BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios. *Revista de Política Agrícola*. Ano XIII - Nº 3 - Jul./Ago./Set. 2004.
- BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUE, R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.30, n.5, p.847-850, 2000.
- CHAPAVAL, L., PIEKARSKI, P. R. B. *Leite de Qualidade*. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 195 p.
- CONSELEITE – Conselho Paritário Produtor-Indústria-PR. Bases para consolidação e diversificação de segmento agroindustrial do leite no Paraná. Castro-PR, 2009. Disponível em: <www3.pr.gov.br/e-parana/atp/pro_gramaleite/pdf/conseleite.pdf> . Acesso em 21 de maio de 2010.
- COSTA, E. O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 17, n. 4, p.21-26, 1995.
- FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 41, n. 2, São Paulo, 2010.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. (2004). Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em Saúde Pública. *Ciência Rural*, 34:1315-1320
- FARKAS, J. Physical methods of food preservation. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (ed.) *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2001, p. 567-591.
- FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2006. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens.

- FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos. Relatório Setorial Preliminar. 2006 Disponível em <http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial/impressao_relatorio.asp?lst_setor=14>. Acesso em 16 de junho de 2010.
- GAO, A.; MUTHARIA, L.; CHEN, S.; RAHN, K.; ODUMERU, J. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Journal of Dairy Science* 85:3198–3205, 2002.
- HARTMANN, W.; ANDRADE, U.V.C.; STEFFENS, M.B.R.; HARTMANN, M.S.; KADOWAKI, M.A.S.; MASSON, M.L.. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na região oeste do Paraná e ocorrência de *Listeria monocytogenes*. *Revista Ars Veterinária*, Jaboticabal-SP, v. 25, n. 2, 072-078, 2009.
- HARTMANN, W. Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes*. Curitiba, PR, 2009. Tese de Doutorado (Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2009.
- HOLANDA, Jr.; E. V.; HOLANDA, E. D.; MADALENA, F. E.; AMARAL, J. B. C.; MIRANDA, W. M. Viabilidade financeira da pasteurização lenta de leite na fazenda: estudo de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n. 1, p. 68-74, 2002.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Evolução da produção de leite no Paraná 1990-2007. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/grafico02.55.php>. Acesso em 22 de junho de 2010.
- IPARDES-EMATER. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná. 183 p. 2008.
- JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; RORVIK, L.M. (2005). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, 99:158-166
- KONEMAN, E.W. et al. *Diagnóstico microbiológico*. In: Micobactérias, Medsi, 2001.
- MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2. Anais... p. 206-217. Maringá, 2002.
- RODRIGUES, J. M. E. Construção e avaliação da eficiência de um pasteurizador de leite alternativo para comunidades rurais. 1996. 171 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1996.
- SCHUSTER, C.; GONZALEZ, H.L.; BÜCHLE, J.; TIMM, C.D. Avaliação de equipamento alternativo para pasteurização lenta de leite previamente envasado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, n. 4, Campinas, 2006.

TIMM, C.D.; GONZALEZ, H.L.; OLIVEIRA, D.S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M.A.; COELHO, F.J.O.; PORTO, C.R. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral produzido em microusinas de região sul do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, v. 17, p. 100-104, 2003.

TIMM, C.D.; BÜCHLE, J.; GONZALEZ, H.L.; SCHUSTER, C. Atividade das enzimas fosfatase e peroxidase como instrumento de verificação da eficácia da pasteurização lenta de leite previamente envasado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 59, n. 340/341, p. 81-83, 2004.

TONDO, E.C.; GUIMARÃES, M.C.M.; HENRIQUES, J.A.P.; AYUB, M.A.Z. (2000). Assessing and analyzing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian Journal of Microbiology*, 46:1108-1114.